



SECCION ARTICULO ORIGINALES
REVISTA CENTRO DE ESTUDIOS EN SALUD
Año 6 Vol 1 No. 7 (Pags. 34 - 42)

INFLUENCIA DE FUENTES DE CARBONO Y NITRÓGENO EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO Y SÍNTESIS DE POLIHIDROHIALCANOATO DE UNA CEPA DE *BACILLUS Micoides* FLB2

Pablo Fernández Izquierdo¹, Fedra Lorena Ortiz Benavides², Oscar Burbano³,
Milena Guerrero F⁴, Jairo España⁵

Fecha recepción junio 2-2006

Enviado a evaluar junio 9-2006

Aceptado octubre 2-2006

RESUMEN

La contaminación ambiental que genera la utilización del plástico derivado del petróleo, plantea su reemplazo por polímeros biodegradables como los polihidroxialcanoatos (PHAs). Los PHAs, son poliésteres producidos por diversas bacterias quienes los acumulan como inclusiones solubles en el citoplasma. Entre las principales especies bacterianas que acumulan PHAs están *Alcaligenes eutropha* o *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Methilobacterium exorquens*, *E.coli* recombinante y más recientemente *Bacillus mycooides*. En la mayoría de bacterias, estos polímeros se producen cuando se suministra en el medio de cultivo una fuente de carbono y se limita un nutriente esencial de crecimiento. Algunas bacterias tienen la capacidad de sintetizar co-polímeros del tipo 3-Hiroxibutirato-co-3-Hidroivalerato, sin embargo, para su síntesis algunas

¹ Candidato a PhD en Microbiología. Profesor Asistente Departamento de Biología Facultad Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad de Nariño. Pasto- Colombia email pfernandez@udenar.edu.co

² Lic Biología, Msc Didáctica de la Biología. Profesora Departamento de Biología. Facultad Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad de Nariño. Pasto- Colombia E-mail ortizfb@latinmail.com

³ Biólogo. Profesor Departamento de Biología. Facultad Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad de Nariño. Pasto- Colombia e-mail pfernandez@udenar.edu.co

⁴ Bióloga. Profesora Departamento de Biología. Facultad Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad de Nariño. Pasto- Colombia e-mail milenag@udenar.edu.co

⁵ Zootecnista. Esp. Pedagogía. Docente Hora Cátedra Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Universidad de Nariño. Pasto. email castorlisto@yahoo.es

de ellas requieren suplementar en el medio de cultivo con propionato, lo cual hace costosa la obtención del co-polímero. En este estudio, se utilizó la cepa FBL2, aislada de suelos de la región andina del departamento de Nariño, identificada como *Bacillus mycooides*, con miras a optimizar un medio de cultivo que favorezca la producción de PHA. Los resultados muestran que esta cepa bacteriana puede sintetizar el co-polímero sin necesidad de adicionar propionato, valerato u otros ácidos grasos de cadena impar considerados precursores monoméricos del PHA, sugiriendo una propiedad importante para este microorganismo con fines industriales.

PALABRAS CLAVES: Polihidroxicanoatos, PHA, Copolímero, Bioplástico, *Bacillus mycoide*

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyoxoesters that are produced by diverse bacteria and that accumulate as intracellular granules. In attention to problem environmental contamination the use of polymere extract to petroleum can be replaced by biodegradable polymer like PHAs. Some genus bacterial to produce PHAs are *Alcaligenes eutropha* o *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Methilobacterium exorquens*, *E.coli recombinant* and more early *Bacillus mycooides*. Any genus bacterial, this polymer is produced by adding in the medium culture a carbon source and a esencial nutrient of growth is limited. Some bacteria have capacity to synthesise co-polymer 3HB-co-3HV, nevertheless, for its synthesis require suplement of culture medium with propionate, which makes the obtaining co-polymer more expensive. In this study, it was used strain FBL2, obtained of soil of Nariño- Colombia, identificated like *Bacillus mycooides* with the purpose of optimizing a culture medium that favors the production PHAs. The results show this bacterial strain it can synthesise the copolymer without necessity to add proptionate, valerate or other fatty acids of uneven chain, monomeric precursor to produce PHAs. This characteristic is important in order to use *B. mycooides* with industrial aims.

KEY WORDS: Polihidroxicanoatos, PHA, Copolymer, Bioplástico, *Bacillus mycoide*

INTRODUCCIÓN

En atención a problemas relacionados con la contaminación ambiental, se ha planteado el interés de remplazar los plásticos derivados del petróleo por polímeros biodegradables como los Polyhydroxyalkanoates (PHAs) que son una clase de poliésteres alifáticos, que algunas bacterias los acumulan como cuerpos de inclusión con el fin de utilizarlos como reserva energética y/o fuente de carbono.

El interés industrial por PHAs surge en gran parte por

sus propiedades termoplásticas y elastoméricas similares a los poliésteres de origen petroquímico, además, numerosas bacterias y hongos pueden hidrolizarlos^{1,2,3} por lo cual, los PHAs son una fuente renovable de poliésteres biodegradables.

Hasta el momento, se han encontrado más de 150 constituyentes diferentes de los PHAs⁴. La mayoría de los PHAs estudiados tienen unidades repetitivas

de $[-O-CH(R)(CH_2)_xCO-]$ El Poli (3-hidroxibutirato) (PHB), es el PHA más abundante en la naturaleza, en este polímero R es CH_3 y x es igual a 1⁽⁵⁾.

Algunas bacterias tiene la capacidad de sintetizar copolímeros construidos por monómeros de diferentes tipos como poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato), estos poliésteres son menos rígidos y quebradizos en comparación con PHB, biopolímero de amplia distribución entre las bacterias ⁶. Hay que aclarar que la composición monomérica del PHA es determinada tanto por el tipo de sustrato del medio de cultivo, como también, por la especificidad de las enzimas implicadas en las rutas metabólicas de los PHAs como las β -cetotilasas y las PHA sintasas. ⁽⁷⁾

En *Alcaligenes eutrophus*, se ha reportado que controlando la concentración de glucosa y propionato en el medio de cultivo se consigue modificar la composición monomérica del co-polímero (3HB-Co-3HV), sin embargo, la adición de propionato al medio incrementa los costos de producción ^{8,9}.

No obstante, nosotros encontramos que *B. mycoides*, puede sintetizar el copolímero sin la necesidad de adicionar al medio de cultivo propionato, valerato u otros ácidos grasos de cadena impar que se han identificado como precursores inmediatos de la unidad monomérica 3-hidroxivalerato, estos resultados sugieren para este microorganismo un elevado potencial industrial ya que permitiría obtener plástico con un menor costo de producción.

Por todo lo anteriormente expuesto y, como un primer paso para la optimización de un medio de cultivo que favorezca la producción de PHA, el propósito de este trabajo fue la evaluación del efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en la síntesis de copolímero sintetizado por la cepa de *Bacillus mycoides* FLB2, bacteria silvestre aislada de suelos de la región andina del departamento de Nariño.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa bacteriana y condiciones de Cultivo

Se utilizó la cepa FBL2 identificada como *Bacillus mycoides*, la cual pertenece al cepario del laboratorio de Biotecnología del programa de Biología de la Universidad de Nariño. Los aislados bacterianos empleados en este trabajo se mantuvieron en tubos de ensayo con medio de cultivo basal conformado por glucosa 5 g, peptona bacteriológica 2,5 g/l, extracto de levadura 2,5 g/l, y agar agar 1,2 g/l.

Influencia de fuentes nutricionales en la síntesis del polímero

Para evaluar el efecto de las fuentes de carbono en la síntesis de PHA se empleó glucosa, sacarosa, melasa y almidón en una proporción de 5 g/L, manteniendo constante el extracto de levadura en una proporción de 2,5 g por litro. Para establecer la influencia de fuentes de nitrógeno en la síntesis del polímero se utilizó peptona, extracto de levadura, extracto de carne, y un hidrolizado ácido de harina de haba (*Vicia faba*), en una proporción de 2,5 g por litro, como fuente de carbono y energía se adicionó glucosa a una concentración de 5 g por litro.

Todos los cultivos fueron realizados en erlenmeyers con volumen nominal de 500 ml de capacidad que contenían 100 ml de caldo de cultivo. Se realizaron tres réplicas por cultivo los cuales se mantuvieron durante 36 horas a 30 ± 2 °C y con agitación de 120 rpm.

Perfil de crecimiento y producción de polímero

El crecimiento celular y la síntesis del polímero fueron registrados con intervalos de 2 horas. El peso seco celular fue calculado por gravimetría, para lo cual 2 ml de medio de cultivo fueron centrifugados a 8.000 rpm, el botón celular fue lavado varias veces

con agua destilada y secado a 80 °C durante 24 horas, el peso seco se registró en balanza analítica con 0,0001 g de precisión.

Cuantificación de polímero

La cuantificación del PHA se realizó mediante el método espectrofotométrico de Slepecky¹⁵, para lo cual las muestras de suspensión celular 1 ml, se centrifugaron y lavaron con agua destilada, en viales de 1.5 ml a 8.000 rpm, durante 5 minutos. Los botones celulares se resuspendieron con hipoclorito de sodio al 5% de cloro libre y EDTA 10 mM, se incubaron a 30 °C durante 1.5 h se centrifugaron y lavaron con agua destilada. El sedimento recuperado se resuspendió en 200^ol de acetona, se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 200^ol de alcohol, se centrifugó nuevamente desechándose el sobrenadante. Las muestras secadas se resuspendieron en 1ml de una solución de H₂SO₄ al 80% y se calentaron en baño de María a 90 °C, durante 30'. Se determinó la absorbancia de la solución 214 nm mediante el espectrofotómetro Cole palmer.

La concentración de PHA (mg.L⁻¹) se calculó según curva patrón de un copolímero comercial PHB-co-PHV, el cual fue hidrolizado bajo las mismas condiciones de las muestras de PHA de la cepa FBL2. La expresión matemática que relaciona la absorbancia con la concentración del copolímero es: $y = 7,4017x + 0,065$ con R² = 0,9857.

Caracterización del polímero

Los caldos de cultivo al final de las fermentaciones fueron centrifugados a 8000 rpm, recuperándose el polímero de las células como se describió anteriormente, pero sin digerir con H₂SO₄. Las muestras se caracterizaron por cromatografía de gases, para ello, un 1 mg de muestra se diluyó con 1 ml de cloroformo y 1 ml de metanol : ácido sulfúrico (85:15, v/v), la mezcla fue calentada a 90 °C durante dos horas, luego fue enfriada rápidamente y 1 ml de NaCl al

0,1% fue adicionado, se separó la fase orgánica de la acuosa y se deshidrató con sulfato de sodio anhidro, 0.5 µl de fase orgánica fue inyectada en el cromatógrafo de gases (GCMS - QP5000 Shimadzu) equipado con una columna capilar de sílica fundida MDN-S de 30metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 um de espesor de película. El inyector y el detector de temperaturas de flama ionizante fue configurado a 250 °C. El programa de temperatura fue de 60 °C durante 2 minutos incrementándose 6 °C por minuto hasta el máximo de temperatura de 220 °C. se utilizó el modo de inyección splitt con una razón de 23:2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la fuente de Carbono

El incremento de biomasa y la acumulación del polímero fueron superiores cuando la bacteria creció en presencia de glucosa, el mayor rendimiento (PHA/biomasa) se logró con melaza y almidón, sin embargo con estas dos fuentes de carbono la producción de PHA (g/l) fue inferior. El efecto de cada una de ellas se puede apreciar en la Tabla 1.

Se estableció que la relación entre la cinéticas de producción de biomasa con la síntesis de polímero se explica a través de un modelo simple cuya expresión matemática es producto $(PHA\ g/l) = 0,0426325 + 0,372736 \times Biomasa(g/l)$ con R² del 98,07% y r = 0,99, que indica una fuerte correlación positiva entre las dos variables, en consecuencia, se puede afirmar que la síntesis de PHA, se encuentra asociada al crecimiento.

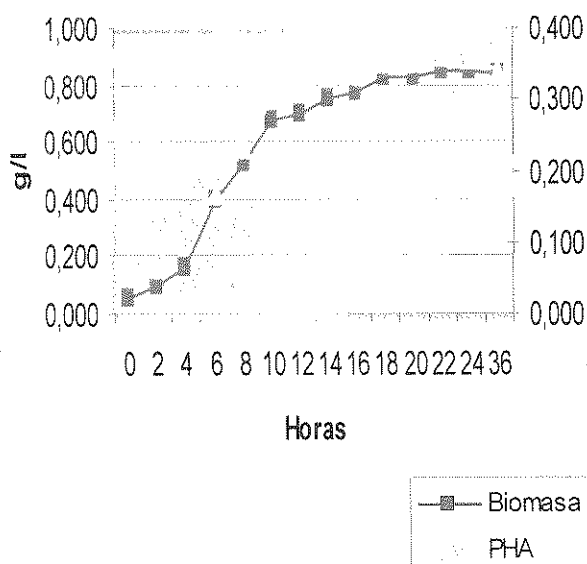
Al observar el perfil del crecimiento de cepa FBL2 (Figura 1), se puede confirmar que el polímero se acumula desde inicio de la fase exponencial del crecimiento sin necesidad del agotamiento de un nutriente esencial, esta es una característica que diferencia la cepa FBL2 de otros grupos de bacterias como

TABLA 1. EFECTOS DE LA FUENTES DE CARBONO
EN LA SÍNTESIS DE PHA

Fuente de Carbono	Biomasa g/L	PHA g/L	Mu	Rendimiento Y _{p/x}	Productividad g L ⁻¹ h ⁻¹
Glucosa	0,86	0,36	0,109	0,42	0,017
Sacarosa	0,84	0,35	0,078	0,42	0,015
Melasa	0,74	0,33	0,119	0,45	0,013
Almidón	0,70	0,32	0,098	0,46	0,013

Alcaligenes eutrophus, *Protomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans*, *Azospirillum brasilense*, en estas bacterias, la síntesis del polímero se inicia a partir de la fase estacionaria de crecimiento 16,17,18. No obstante, la producción de PHA asociada al crecimiento de la cepa FBL2 es una característica comparada con especies como los mutantes de *Azotobacter vinelandii* UWD y las cepas recombinantes de *E.coli* que portan el operón biosintético de *A. eutrophus*, entre otras. 19,20, 21.

CURVA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE PHA



Efecto de la Fuente de Nitrógeno

Se destaca el efecto del extracto de levadura en la producción de biomasa y el extracto de carne en el rendimiento (producto/biomasa) de PHA. Las diferencias encontradas entre estas fuentes de nitrógeno se muestran en la Tabla 2. Estas diferencias son atribuidas a variaciones en la composición de aminoácidos y factores de crecimiento. Los aminoácidos libres presentes en fuentes nitrogenadas complejas contribuyen al crecimiento microbiano. Estos compuestos, pueden ser transportados a la célula sin necesidad de ser metabolizados, el aporte de aminoácidos en el medio de cultivo supone un ahorro de energía y tiempo para la multiplicación celular por ejemplo, para la síntesis de metionina se requieren 8 moléculas de NADPH, en este sentido, si en el medio de cultivo se suministran aminoácidos para promover el crecimiento bacteriano, el consumo de NADPH sería nulo y este a su vez podría utilizarse para la síntesis de PHAs^(22, 23, 24).

Al comparar la composición de aminoácidos se evidencia que el extracto de carne tiene una mayor concentración de glicina, metionina ó arginina en comparación con el extracto de levadura²⁵. Para comprobar que las diferencias en la producción de PHA entre el extracto de carne y extracto de levadura

TABLA 2. Efectos de fuentes de nitrógeno en la síntesis de PHA

Fuente de Nitrógeno	Biomasa g/L	PHA g/L	Mu	Rendimiento Yp/x	Productividad g L ⁻¹ h ⁻¹
E -Levadura	0,86	0,36	0,109	0,42	0,017
E. Carne	0,85	0,37	0,110	0,44	0,015
H. haba	0,78	0,32	0,112	0,41	0,008
Peptona	0,82	0,34	0,105	0,42	0,014

depende de la composición de aminoácidos, se planteó un experimento con un medio de cultivo conformado por glucosa y extracto de levadura en concentraciones similares al medio base, pero, suplementado con los aminoácidos glicina, metionina y arginina. Para el cálculo de los niveles de cada uno de los aminoácidos del extracto de carne frente al extracto de levadura informadas en el manual de oxoid de medios de cultivo. ²⁶

En los diferentes tratamientos de este experimento no se encontraron diferencias significativas en la producción de biomasa (Figura 2), sin embargo, a través de un análisis de varianza simple se encontró

que hay una marcada diferencia en cuando a la producción del biopolímero en g/L ($p = 0,0004$), en este sentido, Los tratamientos extracto de carne y extracto de levadura suplementado con glicina, se destacan en el rendimiento (producto/biomasa) y producción de PHA (Tabla 3).

El efecto de fuentes de nitrógeno ha sido estudiado en relación con la síntesis del PHA, encontrándose que la adición de extracto de levadura, triptona, hidrolizado de caseína y aminoácidos en general incrementan el rendimiento de PHAs, este fenómeno se explica porque PHB es sintetizado desde la Acetil coenzima A (Acetyl-CoA) como resultado de la

FIGURA 2. Efectos de aminoácidos en la síntesis de PHA

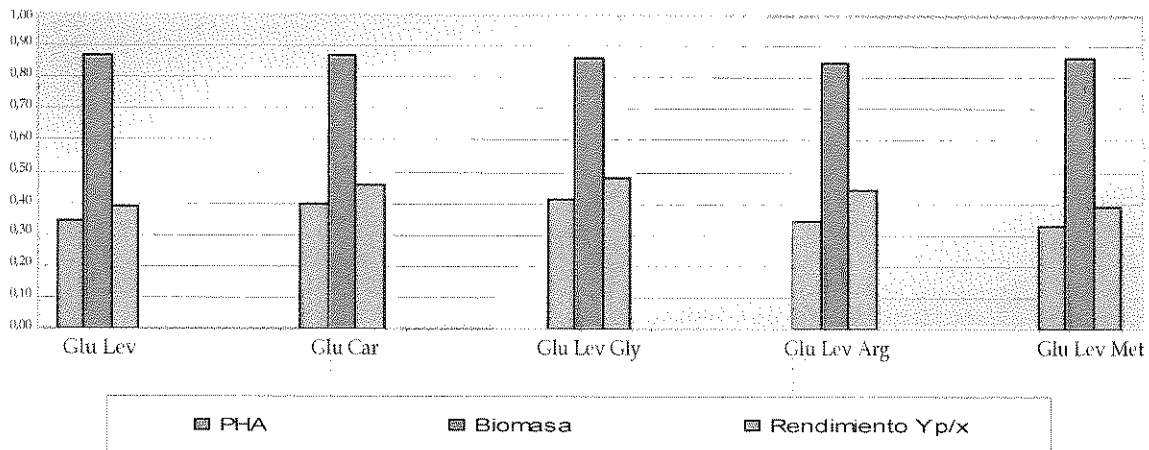


Tabla 3. Efectos de aminoácidos en la síntesis de PHA

	Glu Levadura	Glu E. Carne	Glu Lev Gly	Glu Lev Arg	Glu Lev Met
PHA	0,34	0,40	0,41	0,34	0,33
Biomasa	0,87	0,87	0,86	0,85	0,86
Yp/x	0,39	0,46	0,48	0,44	0,39

acción secuencial de tres enzimas: β -cetotiolasa, Acetoacetyl-CoA reductasa asociada al NADPH, y PHB sintasa^{26,27}. En un medio complejo hay un aporte extrínseco de intermediarios metabólicos, en consecuencia la Acetil CoA que hace parte de varias rutas metabólicas y el NADPH quedan disponibles para la síntesis de PHA porque no se requieren en grandes proporciones para la síntesis de otros compuestos.

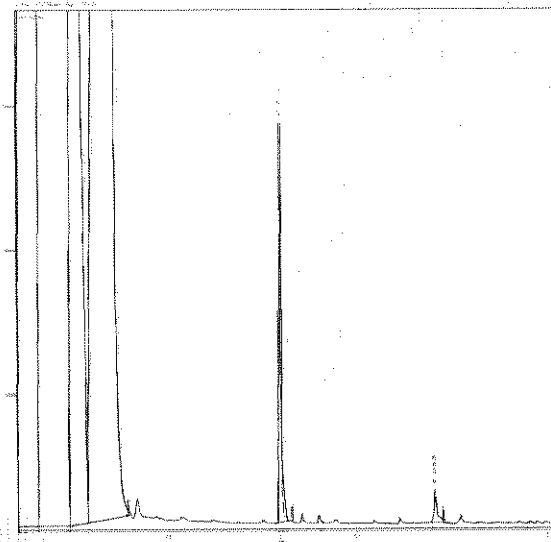
Caracterización del polímero

Los derivados metilados del PHA sintetizado por la cepa FBL2 formaron dos picos a los 3, 9 y 6 minutos, estos tiempos de retención coinciden con los derivados metilados de los monómeros 3-HB y 3-HV (figura 3), en el análisis de la muestra realizado por CG-masas indica que los dos monómeros del PHA de la cepa FBL2, tienen un modelo de fragmentación de masas similar al 3-Hidroxibutirato y al 3-Hidroxivalerato respectivamente.

Como esta cepa se caracteriza por presentar biosíntesis del polímero asociada al crecimiento es factible diseñar un medio de cultivo que favorezca tanto el crecimiento del microorganismo como el redimiendo producto/biomasa.

En consecuencia la optimización de un medio de cultivo será nuestro próximo paso para la producción de plástico biodegradable a partir de la cepa FLB2.

FIGURA 3. Cromatograma obtenido por GC de los derivados metilados de un Copolímero comercial en (a) el primer y segundo pico corresponden a los ésteres de metilo de 3 Hidroxibutirato y 3 Hidroxivalerato, respectivamente, en b) ésteres de metilo del PHA de la cepa FBL2, se observan dos picos con tiempos de retención similares al 3HB y 3HV del copolímero biopol.



AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigaciones, Posgrados y Relaciones Internacionales - VIPRI de la Universidad de Nariño, por la financiación de este proyecto.

REFERENCAS BIBLIOGRAFICAS

- García, B.; Olivera, E. R.; Miñambres, B.; Fernández-Valverde, M.; Cañedo, L. M.; Prieto, M. A.; García, J. L.; Martínez, M.; Luengo, J. M. 1999. Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source: genetic and biochemical studies on a route of the phenylacetyl-CoA catabolon. *J. Biol. Chem.* 274:29228-29241
- Kellerhals, M. B., Kessler, B.; Witholt, B.; Tchouboukov, A.; Brandl, H. 2000. Renewable long-chain fatty acids for production of biodegradable medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) at laboratory and pilot plant scales. *Macromolecules* 33:4690-4698
- Olivera, E. R.; Carnicero, D.; García, B.; Miñambres, B.; Moreno, M. A.; Cañedo, L. DiRusso, C. C.; Naharro, G.; Luengo, J. M. 2001. Two different pathways are involved in the β -oxidation of *n*-alkanoic and *n*-phenylalkanoic acids in *Pseudomonas putida* U: genetic studies and biotechnological applications. *Mol. Microbiol.* 39: 863-874
- Madison, L. L.; Huisman, G. W. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 21- 53.
- Rehm, B. H.; Steinbüchel, A. 1999. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *J. Biol. Macromol.* 25: 3-19
- Anderson, A. J., and E. A. Dawes. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54:450-472.
- Liebergessell, M., Rahalkar, S., Steinbüchel, A. (2000). Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Chromatium vinosum* enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 54:186-94.
- Shuang-Jiang Liu y Steinbüchel Alexander. (2000). A Novel Genetically Engineered Pathway for Synthesis of Poly(Hydroxyalkanoic Acids) in *Escherichia coli* *Appl. Environ. Microbiol.* 66:739-743.
- Silva C. O. C., Gomez L. F., J. Priefert G. C, H., y Steinbüchel A. (2002). Identification of the 2-Methylcitrate Pathway Involved in the Catabolism of Propionate in the Polyhydroxyalkanoate-Producing Strain *Burkholderia sacchari* IPT101^r and Analysis of a Mutant Accumulating a Copolyester with Higher 3-Hydroxyvalerate Content. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:271-279.
- Pablo Fernández Izquierdo, Fedra L. Ortiz Benavides, Jairo España. 2005. Caracterización de poli-(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) sintetizado por una cepa silvestre de *Bacillus mycoides*, FBL2.
- Lemos, P. C., Serafim, L. S., Santos, M. M., Reis, M. A. M., y Santos, H. (2003). Metabolic Pathway for Propionate Utilization by Phosphorus-Accumulating Organisms in Activated Sludge: ¹³C Labeling and In Vivo Nuclear Magnetic Resonance. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 241-251.
- Valentin, H. E., y D. Dennis. (1996). Metabolic pathway for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) formation in *Nocardia corallina*: Inactivation of mutB by chromosomal integration of a kanamycin resistance gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:372-379.
- Brämer, C., Silva, O. L. F., Gomez, J. G. C., Priefert, H., y Steinbüchel, A. (2002). Identification of the 2-Methylcitrate Pathway Involved in the Catabolism of Propionate in the Polyhydroxyalkanoate-Producing Strain *Burkholderia sacchari* IPT101T and Analysis of a Mutant Accumulating a Copolyester

- with Higher 3-Hydroxyvalerate Content. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:271-279.
14. Tsuneo Tamane, Tiang-fu Then, y Thunsaku Teda. (1996). Growth-Associated Production of Poly(3-Hydroxyvalerate) from n-Pentanol by a Methylotrophic Bacterium, *Paracoccus denitrificans* Vol. 62, No. 2.
 15. Slepecky, J. (1960). A rapid spectrophotometric assay of alpha and beta unsaturated acid and betahydroxyacids. *Anal. Chem.* 32:1697-1699.
 16. Peoples, O. P., and A. J. Sinskey. (1989). Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC). *J. Biol. Chem.* 264:15298-15303
 17. Suzuki, T., H. Deguchi, T. Yamane, S. Shimizu, and K. Gekko. (1988). Control of molecular weight of poly- β -hydroxybutyric acid produced in fed-batch culture of *Protomonas extorquens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27:487-491
 18. Tal, S., Smirnoff, P. y Okon, Y. (1990). The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* during balanced growth and starvation. *Journal of General Microbiology.* 136:1191-1195..
 19. Page, W.J., y Knoosp, O. (1989). Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1334-1339
 20. Sang Yup lee and Ho Nam Chang. (1995). Production of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) by recombinant *Escherichia coli* strains: genetic and fermentation studies. *Can. J. Microbiol.* 41 (suppl. 1): 207-215.
 21. Bernd H. A. Rehm, Timothy A. Mitsky, and Alexander Steinbüchel. 2001. Role of Fatty Acid De Novo Biosynthesis in Polyhydroxyalkanoic Acid (PHA) and Rhamnolipid Synthesis by Pseudomonads: Establishment of the Transacylase (PhaG)-Mediated Pathway for PHA Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, No. 7, p. 3102-3109.
 22. Op cit Tal, S., Smirnoff, P. y Okon, Y. (1990). The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* during balanced growth and starvation. *Journal of General Microbiology.* 136:1191-1195.
 23. Belova, L.L., Sokolov, A.P. Sidorov, I.A. y Trotsenko, Y. A. (1997). Purification and characterization of NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase from *Methylobacterium extorquens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 156:275-279.
 24. Fukui, T., M. Ito, T. Saito, y T. Kenkichi. (1987). Purification and characterization NADP-linked acetoacetyl-CoA reductase from *Zoogloea ramigera* I-16-M. *Biochem. Biophys. Acta* 917:365-371
 25. Bridson E.Y. (1990). *The Manual oxid.* Alphaprint, Alton, Hants section 3 pg 13.
 26. Haywood, G. W., Anderson, A. J., Chu, L. y Dawes, E. A. (1988). The role of NADH and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductase in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 52:259-264.
 27. Fukui, T., M. Ito, T. Saito, and T. Kenkichi. (1987). Purification and characterization NADP-linked acetoacetyl-CoA reductase from *Zoogloea ramigera* I-16-M. *Biochem. Biophys. Acta* 917:365-371.

